

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類 C12N 1/21, C12P 13/14, C12N 15/01 // (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 13/14, C12R 1:19)	A1	(11) 国際公開番号 WO97/08294 (43) 国際公開日 1997年3月6日(06.03.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01944 (22) 国際出願日 1996年7月12日(12.07.96) (30) 優先権データ 特願平7/214583 1995年8月23日(23.08.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 松井和彦(MATSUI, Kazuhiko)(JP/JP) 深瀬久美子(HUKASE, Kumiko)(JP/JP) 辻本信晴(TSUJIMOTO, Nobuharu)(JP/JP) 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP)		(81) 指定国 BR, CN, DE, JP, US. 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING L-GLUTAMIC ACID BY FERMENTATION METHOD (54) 発明の名称 発酵法によるL-グルタミン酸の製造法 (57) Abstract A process for economically and efficiently producing L-glutamic acid by enhancing the L-glutamic acid productivity of a valine-tolerant wild strain from among microorganisms belonging to the genus <i>Escherichia</i> . A strain belonging to the genus <i>Escherichia</i> to which a sensitivity to valine has been imparted and the phosphoenolpyruvate carboxylase activity and the citrate synthase activity of which have been amplified is incubated in a liquid medium and the L-glutamic acid thus accumulated in the culture medium is taken up. 		

(57) 要約

エシェリヒア属に属する微生物の内、バリン耐性を示す野生株のＬーグルタミン酸の生産能を向上させ、安価かつ効率的なＬーグルタミン酸の製造法を提供する。

エシェリヒア属に属し、バリンに対する感受性が付与され、かつホスホエノールピルベートカルボキシラーゼ活性とクエン酸シンターゼ活性が増幅された株を液体培地で培養し、培養液中にＬーグルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを採取する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出版をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	IL	イスラエル	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	リベリア	RO	ルーマニア
AN	アンдорラ	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	RS	セルビア
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロバキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	TM	トルクメニスタン
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	MC	モナコ	TR	トルコ
BF	ブルキナファソ	GU	グアタマラ	MD	モルドバ	UA	ウクライナ
BG	ブルガリア	HN	ホンデュラス	MG	マダガスカル	UG	ウガンダ
BN	ブルネイ	IE	アイルランド	MK	マケドニア	US	アメリカ合衆国
BO	ボリビア	IT	イタリア	ML	マリ	UY	ウルグアイ
BR	ブラジル	JP	日本	MN	モンゴル	UZ	ウズベキスタン
BS	バハマ	KE	ケニア	MR	モーリタニア		
BT	ブータン	KH	カンボジア	MW	マラウイ		
BV	バレンツェ	KR	韓国	MX	メキシコ		
BZ	ベリーズ	LA	ラオス	MY	マレーシア		
		LV	ラトヴィア	NE	ニジェール		
		LY	リビア	NG	ナイジェリア		
				NL	オランダ		
				NO	ノルウェー		
				NZ	ニュージーランド		

明細書

発酵法によるＬ－グルタミン酸の製造法

5 技術分野

本発明は、発酵法によるＬ－グルタミン酸の製造法に関する。Ｌ－グルタミン酸は、食品、医薬品等として重要なアミノ酸である。

背景技術

- 10 従来、Ｌ－グルタミン酸は、主としてブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属またはミクロバクテリウム属に属するいわゆるコリネ型
- Ｌ－グルタミン酸生産菌またはそれらの変異株を用いた発酵法により製造されている（アミノ酸発酵、学会出版センター、１９５～２１５頁、
- 15 １９８６年）。その他の菌株を用いた発酵法によるＬ－グルタミン酸の製造法としては、バチルス属、ストレプトミセス属、ペニシリウム属等の微生物を用いる方法（米国特許第３，２２０，９２９号）、シュード
- モナス属、アースロバクター属、セラチア属、キャンディダ属等の微生物を用いる方法（米国特許第３，５６３，８５７号）等が知られている。
- 従来の方法によりＬ－グルタミン酸の生産性はかなり高まってはいるが、
- 20 今後の需要の一層の増大に応えるためには、さらに安価かつ効率的なＬ－グルタミン酸の製造法の開発が求められている。

- エシェリヒア属細菌は、その増殖速度の大きさ及び遺伝子解析の進み方から将来的に優れたＬ－グルタミン酸生産菌として利用される可能性を有している。従来報告では、エシェリヒア属に属する野生株エシェ
- 25 リヒア・コリW由来の変異株が極めて低いレベルである２．３ｇ／ｌのＬ－グルタミン酸を蓄積したことが報告されているのみであった（J.

Biochem.、第50巻、164~165頁、1961年)が、最近、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(以下、 α -KGDHと略す)活性が欠損もしくは低下したエシェリヒア・コリK-12由来の変異株が高いL-グルタミン酸生産能を有することが明らかにされた(特
5 開平5-244970号)。エシェリヒア属に属する野生株には、エシェリヒア・コリK-12やその変異株より優れた性質を有するものがある。例えば、エシェリヒア・コリBはエシェリヒア・コリK-12及びK-12株由来の変異株よりも高い生育速度を示し、かつ消費糖当りの菌体収率が高いことが報告されている(J. Biotechnology
10 gy、第2巻、191~206頁、1985年; Appl. Environ. Microbiol.、第56巻、1004~1011頁、1990年)。

本発明の目的は、エシェリヒア属に属するL-グルタミン酸生産菌を育種し、より安価かつ効率的なL-グルタミン酸の製造法を提供すること
15 にある。

発明の開示

本発明者らは、エシェリヒア属細菌によるL-グルタミン酸の製造法について鋭意研究を重ねた結果、バリン感受性株に、クエン酸シンター
20 ゼ(以下、CSと略す)活性及びフォスフォエノールビルベートカルボキシラーゼ(以下、PPCと略す)活性を増幅させた菌株が高いL-グルタミン酸生産能を持つことを見だし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(発明1) エシェリヒア属に属し、バリン感受性を示し、クエン酸シン
25 ターゼ活性及びフォスフォエノールビルベートカルボキシラーゼ活性が増幅され、かつL-グルタミン酸生産能を有する菌株。

(発明2) α-KGDH活性が欠損もしくは低下している発明1記載の菌株

(発明3) エシェリヒア・コリに属する発明1又は2記載の菌株。

(発明4) エシェリヒア・コリB株に属する発明3記載の菌株。

5 (発明5) エシェリヒア・コリK-12株に属する発明3記載の菌株。

(発明6) 発明1ないし5記載の菌株を液体培地に培養し、培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを採取することの特徴とする発酵法によるL-グルタミン酸の製造法。

10 図面の簡単な説明

第1図は、プラスミドpMWCPの構築過程を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

(1) バリン感受性変異株の取得

15 本発明の菌株を育種するためには、まず、エシェリヒア属に属し、バリン耐性を示す野生株もしくはその変異株を親株とし、バリン感受性変異株を得る。このような野生株の具体的な例としては、次の様な株が挙げられる。

エシェリヒア・コリB(ATCC11303)

20 エシェリヒア・コリW(ATCC9637)

エシェリヒア属に属し、バリン耐性を示す株からバリン感受性変異株を分離する方法は以下の様である。

まず、上記のバリン耐性株に通常の変異処理法、例えば、X線や紫外線の照射あるいはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

25 (以下、NGと略す)等の変異剤に接触せしめる等の方法を適用し、変異を導入する。

W 97/08294

PCT/JP96/01944

4

あるいは、遺伝子工学的手法、例えば形質導入、遺伝子組換え法等を用いることによっても目的の変異を効率良く導入することができる。

形質導入によるバリン感受性株の取得方法は以下の通りである。すなわち、エシェリヒア・コリK-12はバリン感受性であることが知られている（アミノ アシド：バイオシンセシス アンド ジェネティック レギュレーション、クラウス ハーマン アンド ロナルド ソマヴィル編、アディソン・ウェスリーパブリッシングカンパニー、250～251項、1983年）ので、P1ファージ等をエシェリヒア・コリK-12に感染させ、調製したファージ溶菌液を用いてバリン耐性を示す株にエシェリヒア・コリK-12由来のバリン感受性を導入することができる。

親株への変異処理または形質導入によりバリン感受性を導入した後、目的とするバリン感受性株は、バリンを含む最少培地で生育できないかもしくは生育速度が著しく低下した変異株として分離できる。

15 以上の様にして得られるバリン感受性株の具体的例としてはエシェリヒア・コリB11が挙げられる。

エシェリヒア・コリB11は、エシェリヒコリ・コリBから突然変異により誘導されたバリン感受性株である。このような変異株は、バリン感受性の付与によりビルビン酸からバリンに至る生合成経路の流れが抑えられており、結果としてビルビン酸からアセチルC₆Aに向かう生合成経路の流れが改善されていることが予想される。

なお、エシェリヒア属に属し、バリン感受性を示す株を新たに取得しなくとも、既知のものを用いても問題ない。そのような株としてエシェリヒア・コリK-12株、エシェリヒア・コリW3110株等がある。

25 また、特開平5-244970号公報に開示されるエシェリヒア・コリAJ12624株及びエシェリヒア・コリAJ12628株はいずれも

エシェリヒア・コリW3110株に由来し、 α -KGDH活性が欠損もしくは低下している株である。 α -KGDH活性が欠損もしくは低下している株は、グルタミン酸生産能が向上しているので本発明の菌株としてより好ましい。

5 (2) PPC活性とCS活性の増幅

後述の実施例では、エシェリヒア属に属し、PPC活性とCS活性が増幅された菌株の取得を、エシェリヒア属に属するバリン感受性株を宿主として行った。しかし、エシェリヒア属に属するバリン耐性株を宿主とし、PPC活性とCS活性が増幅された菌株の取得を行った後に、バ
10 リン感受性を付与するという育種を行ってもかまわない。

従って、PPC活性とCS活性が増幅された菌株を調製するために使用される宿主としては、エシェリヒア属に属し、バリン感受性が付与された変異株またはエシェリヒア属に属し、バリン耐性を有する野生株もしくはその変異株が用いられる。このような宿主の具体的な例としては、
15 次の様な株が挙げられる。

エシェリヒア・コリB11

エシェリヒア・コリK-12 (ATCC10798)

エシェリヒア・コリB (ATCC11303)

エシェリヒア・コリW (ATCC9637)

20 PPC活性とCS活性を増幅するには、PPC及びCSをコードする遺伝子を適当なベクター上にクローニングし、得られた組み換えベクターを用いて上記宿主を形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のPPC及びCSをコードする遺伝子（以下、それぞれppc遺伝子及びglutA遺伝子と略する）のコピー数が上昇する結果、PPC活性及びC
25 S活性が増幅される。なお、ベクターとはプラスミドベクター、ファージベクター、トランスポゾンベクター等がある。

ppc遺伝子及びgltA遺伝子は、それぞれPPC活性及びCS活性を欠失した変異株を用いて、その栄養要求性を相補する遺伝子を単離することによって取得できる。また、エシェリヒア・コリのこれらの遺伝子は既に塩基配列が明らかにされていることから（J. Biochem.、第95巻、909～916頁、1984年；Biochemistry、第22巻、5243～5249頁、1983年）、それぞれの塩基配列に基づいてプライマーを合成し、染色体DNAを鋳型にしてPCR法により取得することが可能である。

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、エシェリア属細菌において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

ppc遺伝子及びgltA遺伝子は、一種類のベクター上にクローン化されて宿主となる上記出発親株に導入されるか、または共存可能な二種類のベクター上に別々にクローン化されて宿主菌株に導入される。

PPC活性及びCS活性の増幅は、ppc遺伝子及びgltA遺伝子をプラスミドベクターに連結してプラスミドの形で細胞内に維持させて達成できる。あるいは同遺伝子を上記宿主の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。エシェリヒア属に属する微生物の染色体DNA上にppc遺伝子及びgltA遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レベティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、ppc遺伝子及びgltA遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のppc遺伝子及び

gltA遺伝子のコピー数が上昇する結果、PPC活性及びCS活性が増幅される。

PPC活性とCS活性の増幅は、上記の遺伝子増幅による以外に、ppc遺伝子及びgltA遺伝子のプロモーターを強力なものに置換することによっても達成される。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのPRプロモーター、PLプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、ppc遺伝子及びgltA遺伝子の発現が強化されることによってPPC活性及びCS活性が増幅される。

Ｌーグルタミン酸分解活性の低下した性質や、マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ／フォスファターゼオペロン（以下、aceオペロンと略す）の発現が構成的になった性質を併せ持たせることによりＬーグルタミン酸の生産性が向上することが報告されており（特開平５－２４４９７０号）、これらの性質を本発明のＬーグルタミン酸生産株が併せ持つことはＬーグルタミン酸の生産性向上に有利であることは容易に予測される。

また、従来よりＬーグルタミン酸生産菌の生産能向上に有効な性質として知られている各種栄養要求性、薬剤耐性、薬剤感受性、または薬剤依存性等の性質を本発明のＬーグルタミン酸生産株が更に併せ持つことが、Ｌーグルタミン酸生産性向上の面から有利であることはいうまでもない。

（３）本発明の菌株を用いたＬーグルタミン酸の生産

エシェリヒア属に属し、バリン感受性が付与され、かつPPCとCS活性が増幅されたＬーグルタミン酸生産能を有する菌株を用いてＬーグルタミン酸を生産させるには、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の栄養

培地を用いて常法により行うことができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源及び窒素源は、培養する菌株の利用可能なものならばいずれの種類を用いてもよい。

- 炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、シュクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の糖類が使用され、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸等も単独あるいは他の炭素源と併用して用いられる。

- 窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用される。

有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆蛋白分解物等が使用され、生育にアミノ酸等を要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添する事が必要である。

- 無機塩類としてはリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用される。

- 培養方法は、発酵温度 20 ないし 45℃、pH を 5 ないし 9 に制御しつつ通気培養を行う。培養中に pH が下がる場合には、炭酸カルシウムを加えるか、アンモニアガス等のアルカリで中和する。かくして 10 時間ないし 4 日間程度培養することにより培養液中に著量の L-グルタミン酸が蓄積される。

- 培養終了後の培養液から L-グルタミン酸を採取する方法は、公知の回収方法に従って行えばよい。例えば、培養液から菌体を除去した後に濃縮晶析する方法あるいはイオン交換クロマトグラフィー等によって採取される。

実施例

次に、実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

(1) エシェリヒア・コリ B からのバリン感受性株の分離

エシェリヒア・コリ B 及びエシェリヒア・コリ K-12 由来の W 3 1
 5 1 0 株の細胞懸濁液 (10^5 / ml) 5 μ l を各種濃度のバリンを含む
 M 9 最少寒天培地 (ア ショート コース イン バクテリアル
 ジェネティクス、コールド スプリング ハーバー ラボラトリープレ
 ス、ジェフリー ミラー著、4 3 7 頁、1 9 9 2 年) 上に接種し、3
 7 $^{\circ}$ C で一晩培養し、生育の可否を検討したところ、エシェリヒア・コリ
 10 B は 5 g / l のバリンを含む M 9 最少培地上で生育可能であったのに対
 して、エシェリヒア・コリ W 3 1 1 0 は 5 0 m g / l のバリンを含む M
 9 最少培地上ですら生育できなかった。尚、いずれの株もバリンを含ま
 ない M 9 最少培地上では良好な生育が見られた。

そこで、エシェリヒア・コリ B から W 3 1 1 0 株と同等のバリン感受
 15 性を有する変異株の分離を以下のようにして行った。

2 Y T 液体培地 (バクトトリプトン 1 6 g / l、バクトイーストエキ
 ストラクト 1 0 g / l、NaCl 5 g / l、pH 7. 2) にて 3 7 $^{\circ}$ C で
 一晩培養したエシェリヒア・コリ B を再度 2 Y T 液体培地に接種して 3
 7 $^{\circ}$ C にて培養し、対数増殖期にある菌体を集菌し、5 0 m M のリン酸
 20 バッファー (pH 6. 0) で洗浄後、2 0 0 μ g / ml の NG を含むリ
 ン酸バッファーに懸濁し、3 7 $^{\circ}$ C で 3 0 分間振とう培養した。ついで集
 菌し、リン酸バッファーで洗浄後、一部を 2 Y T 液体培地に接種し、3
 7 $^{\circ}$ C で一晩培養し、変異の固定を図った。培養後の菌体を集菌後
 、リン酸バッファーで洗浄し、一部をバリン 1 0 0 m g / l を含む M 9
 25 最少液体培地に植菌し、3 7 $^{\circ}$ C にて 2 時間培養した。その後 2 0 0 ユ
 ニット / ml になるようにペニシリンを添加し、さらに一晩培養し、バ

- リン感受性変異株の濃縮を行った。次いで培養液を適当に希釈し、生菌数を測定した。生菌数に基づいてレプリカの操作に適するように培養液を希釈し、M9 最少寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。出現したコロニーをレプリカ法によりバリンを含まないM9 最少寒天培地及び
- 5 100 mg/l のバリンを含む最少寒天培地に移植し、37℃で一晩培養し、バリンを含む培地で生育できないバリン感受性候補株を分離した。得られた候補株は単コロニー分離の後、各種濃度のバリンを含むM9 最少寒天培地上での生育を調査し、バリン50 mg/l を含むM9 最少寒天培地で生育できない変異株としてバリン感受性変異株3株を分離した。
- 10 エシェリヒア・コリB及び得られたバリン感受性株3株を表1の組成の培地5 ml を分注した50 ml 容大型試験管に接種し、37℃にて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。培養終了後、培養液上清のL-グルタミン酸蓄積量を旭化成工業製バイオテックアナライザーにより測定した。その結果、エシェリヒア・コリB及びいずれのバリン感受
- 15 性株も培養液中にL-グルタミン酸を蓄積しなかった。一方、薄層クロマトグラフィー上でのニンヒドリン発色により、各培養液上清中のバリンの生成を調べたところ、B株ではわずかに認められたバリンのスポットがバリン感受性株では認められなかった。
- 分離したバリン感受性株の内の代表株をエシェリヒア・コリB11と
- 20 名付け、以下の実験に用いた。

表 1

5	成 分	濃 度 (g/l)
	グルコース	40
	(NH ₄) ₂ SO ₄	20
	KH ₂ PO ₄	1
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1
10	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
	MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.01
	酵母エキス	2
	チアミン塩酸塩	0.01
	CaCO ₃	20
15		

(2) エシェリヒア・コリW3110のgltA遺伝子のクローニング
 エシェリヒア・コリK-12のgltA遺伝子の塩基配列は既に明ら
 かにされている(Biochemistry、第22巻、5243~5
 20 249頁、1983年)。報告されている塩基配列に基づいて配列表配
 列番号1及び2に示すプライマーを合成し、エシェリヒア・コリW31
 10の染色体DNAを鋳型にしてPCR法によりgltA遺伝子を増幅
 した。

合成したプライマーの内、配列番号1は、Biochemistry、
 25 第22巻、5246頁、1983年に記載されているgltA遺伝子の
 塩基配列図の-342番目から-323番目の塩基に至る配列に相当す
 るが、-331番目の塩基GをCに変更し、制限酵素Pst Iの認識配

列を挿入している。配列番号2は、*Biochemistry*、第22巻、5247頁、1983年に記載されている $gltA$ 遺伝子の塩基配列図の2060番目から2079番目の塩基に至る配列に相当するが、2070番目の塩基AをGに変更し、制限酵素EcoRIの認識配列を5'側から表記したものである。

エシェリヒア・コリW3110株の染色体DNAの調製は常法によった（*生物工学実験書*、日本生物工学会編、97～98頁、培風館、1992年）。また、PCR反応は、PCRテクノロジー（ヘンリーエーリッヒ編、ストックトンプレス、1989年）8頁に記載されている標準反応条件を用いた。

生成したPCR産物を常法により精製後、制限酵素PstIとEcoRIを反応させ、ライゲーションキット（宝酒造製）を用いてPstIとEcoRIで切断したpTWV228（宝酒造製）と連結した後、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル（宝酒造製）を用いて形質転換を行い、IPTG（イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド）10 μ g/ml、X-Gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド）40 μ g/ml及びアンピシリン100 μ g/mlを含む培地（バクトトリプトン10 g/l、バクトイーストエキストラクト5 g/l、NaCl 5 g/l、寒天15 g/l、pH 7.2）に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。

形質転換株からアルカリ法（*生物工学実験書*、日本生物工学会編、105頁、培風館、1992年）を用いてプラスミドを調製した後、ベク

ターに挿入されたDNA断片の制限酵素地図を作成し、報告されている *gltA* 遺伝子の制限酵素地図と比較し、同一制限酵素地図を有するDNA断片が挿入されているプラスミドを *pTWVC* と名づけた。

- さらに *gltA* 遺伝子が発現していることを確認するため、*pTWVC*
- 5 *C* を塩化ルビジウム法（最新農学実験の基礎、東北大学農学部農学科編、ソフトサイエンス社、157頁、1990年）により調製した *gltA* 欠損株 *ME8330* (*gltA6*、*fur::Tn5*、*galK30*、*pyrD36*、*relA1*、*rpsL129*、*thi-1*、*supE44*、 λ^-) のコンピテントセルに導入し、得られた形質転換株の栄養要求性を確認し、*pTWVC* が *ME8330* 株の *gltA6* を相補することを確認した。*ME8330* 株は、国立遺伝学研究所遺伝実験生物保存研究センターから入手したもので、*gltA* 欠損によりL-グルタミン酸要求性を示し、チアミン、ウラシルとL-グルタミン酸を添加したM9最少培地上で生育できる。
- 15 *W3110*、*gltA* 欠損株 *ME8330*、及び *pTWVC* を保持する *ME8330* 株のCS活性を *Weitzman* 等の方法 (*Methods in Enzymology*、第13巻、22~26頁、1969年) により測定した。その結果、表2に示すように、*ME8330* 株ではCS活性は全く認められず、一方 *pTWVC* を保持する *ME8330*
- 20 株では野生株 *W3110* 株の約4倍のCS活性を示すことが確認された。

表 2

5	菌 株	C S 活性 (units/mg蛋白質)
	W 3 1 1 0	0. 6 9
	M E 8 3 3 0	0
	M E 8 3 3 0 / p T W V C	2. 7 1

10

(3) p p c 遺伝子及び g l t A 遺伝子を有するプラスミドの作成

p p c 遺伝子及び g l t A 遺伝子を有するプラスミド p M W C P の構築過程を図 1 に示した。

まず、p B R 3 2 2 の S a l I サイトにエシェリヒア・コリ K-1 2
 15 に由来する p p c 遺伝子の全領域を含む 4. 4 K b の S a l I 断片が挿入されたプラスミド p S 2 (J. B i o c h e m. 、第 9 5 巻、9 0 9-9 1 6 頁、1 9 8 4 年) を S a l I で消化し、アガロースゲル電気泳動により p p c 遺伝子を含む 4. 4 K b の S a l I 断片を分離し、p M W 1 1 9 (ニッポンジーン製) の S a l I サイトに挿入した。本プラス
 20 ミドを p M W P と名付けた。一方、g l t A 遺伝子を有する DNA 断片が挿入されている p T W V C を P s t I で消化し、T 4 DNA ポリメラーゼで両末端を平滑末端にし、さらに E c o R I で消化した。このようにして得られた DNA 断片と S m a I 、E c o R I で消化した p M W P を混合し、ライゲーション反応に供した。ライゲーション反応後の D
 25 NA サンプルを用いて M E 8 3 3 0 株を形質転換し、アンピシリン耐性で L-グルタミン酸要求性を消失した形質転換株を分離した。この株よりプラスミドを調製し、再度 M E 8 3 3 0 株を形質転換し、L-グルタミン酸要求性の消失を確認した。さらに制限酵素地図を作成し、本プラ

スミド上に *ppc* 遺伝子、*gltA* 遺伝子が存在することを確認し、本プラスミドを *pMWCP* と名付けた。形質転換方法は塩化ルビジウム法を用いた。

(4) エシェリヒア・コリ B 及びバリン感受性変異株 B 1 1 への *pMW*
5 *CP* の導入と培養評価

エシェリヒア・コリ B 株及びそのバリン感受性 B 1 1 株を塩化ルビジウム法によりプラスミド *pMWCP* で形質転換し、それぞれ独立に得られた形質転換株 3 株をそれぞれ表 1 の組成の培地 5 ml を注入した 50 ml 容大型試験管に接種して、37℃にて培地中の糖が消費されるまで
10 振とう培養した。また、B 1 1 株に *pMW119* に *ppc* 遺伝子のみがクローン化されているプラスミド *pMWP*、または *pTWVC* から調製した *gltA* 遺伝子を含む *PstI-EcoRI* 断片を *pMW119* の *PstI* サイトと *EcoRI* サイトの間に連結したプラスミド *pMWC* を導入して得た形質転換株についても同様に培養した。尚、形質転換株
15 の培養に際しては、プラスミドを安定に保持させるため、アンピシリンを 100 µg/ml の濃度で添加した。

培養終了後、培養液中に蓄積した L-グルタミン酸を測定した結果を表 3 に示す。形質転換株の培養結果は 3 株の平均値を示した。バリン耐性を示すエシェリヒア・コリ B を宿主として *CS* 活性と *PPC* 活性を増
20 幅した株では L-グルタミン酸の蓄積が見られなかったのに対して、バリン感受性である B 1 1 株を宿主として *CS* 活性と *PPC* 活性を増幅した場合には、微量の L-グルタミン酸の蓄積が見られた。また、B 1 1 株に *pMWP* を導入し *PEPC* 活性のみを増幅した株では L-グルタミン酸の蓄積が全く見られず、一方、B 1 1 株に *pMWC* を導入し *CS* 活
25 性のみを増幅した株では L-グルタミン酸の蓄積が見られたが、その蓄積量は *CS* 活性と *PEPC* 活性を同時に増幅した場合に及ばず、培養結

果にバラツキが見られ、安定した結果が得られなかった。

表 3

5	菌 株	宿主の形質	L-グルタミン酸蓄積量
			(g/L)
	B / pMWCP	バリン耐性	0
10	B 1 1 / pMWCP	バリン感受性	9. 8
	B 1 1 / pMWP	バリン感受性	0
	B 1 1 / pMWC	バリン感受性	3. 6

15 以上の結果から、エシェリヒア・コリBのようにバリン耐性を示す野生株からL-グルタミン酸生産菌を育種するには、バリン感受性変異とCS活性及びPPC活性の増幅を組み合わせることが必須であることが判明した。gltA遺伝子とppc遺伝子を有するプラスミドpMWC

20 PをB 1 1株に導入した株をAJ 1 3 1 3 8と命名した。

20 エシェリヒア・コリB由来のバリン感受性変異株B 1 1は、寄託したAJ 1 3 1 3 8株より宿主細胞を損なうことなく宿主細胞中のプラスミドを除去することにより得られる。プラスミドは宿主より自然に失われることもあるし、除去操作によって除くこともできる(Bact. Rev.、第36巻、361-405頁、1972年)。プラスミドを除去

25 操作により除くには、AJ 1 3 1 3 8株をLブロス中で40℃で一晩培養後、培養液を適当に希釈してアンピシリンを含有しないL培地に塗布し、37℃で一晩培養後、出現したコロニーをアンピシリン100μg/mlを含むL培地に移植し、アンピシリン感受性のコロニーを分離す

る。かくして得られる株がB11株である。

(5) エシェリヒア・コリK-12へのpMWCPの導入と培養評価

エシェリヒア・コリW3110sucA::Km^rを塩化ルビジウム法によりプラスミドpMWP、pMWC及びpMWCPで形質転換し、

- 5 それぞれ独立に得られた形質転換株4株ずつをそれぞれ表4の組成の培地20mlを注入した500ml容坂口フラスコに接種して、37℃にて培地中の糖が消費されるまで25時間振とう培養した。尚、形質転換株の培養に際しては、プラスミドを安定に保持させるため、アンピシリンを100μg/mlの濃度で添加した。エシェリヒア・コリW3110sucA::Km^rはEP公開公報0670370に開示される株で、sucA遺伝子が破壊されているためα-KGDH活性が欠損している。

表4

15	成 分	濃 度 (g/l)
	グルコース	20
	(NH ₄) ₂ SO ₄	20
20	KH ₂ PO ₄	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
	MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01
	酵母エキス	2
25	チアミン塩酸塩	0.01
	CaCO ₃	3

培養終了後、培養液中に蓄積したL-グルタミン酸を測定した結果を表5に示す。形質転換株の培養結果は4株の平均値を示した。バリン感受性であるエシェリヒア・コリK-12株由来の α -KGDH欠損株を宿主としてCS活性とPPC活性を増幅した場合に、著量のL-グルタミン酸の蓄積が見られた。

表 5

10	菌 株	L-グルタミン酸蓄積収率
		(%)
	W3110 <i>sucA</i> ::Km ^r	41.1
	W3110 <i>sucA</i> ::Km ^r /pMWP	42.3
15	W3110 <i>sucA</i> ::Km ^r /pMWC	44.5
	W3110 <i>sucA</i> ::Km ^r /pMWCP	47.3

産業上の利用可能性

20 本発明の方法により、エシェリヒア属に属し、バリン耐性を示す野生株のL-グルタミン酸生産能を高めることができ、L-グルタミン酸を安価かつ効率的に製造することができる。

25 エシェリヒア・コリAJ12624は、平成3年7月24日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号 郵便番号305）に受託番号FERM P-12379として寄託されている。本株は平成4年5月15日付けでブタベスト条約に基づく国際寄託に移管されており、受託番号FERM BP-3853が付与されて

WO 97/08294

PCT/JP96/01944

19

いる。

エシェリヒア・コリ A J 2 6 2 8 は、平成 3 年 7 月 2 4 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 郵便番号 3 0 5）に受託番号 F E R M P - 1 2 3 8 0 として寄託されている。本株は平成 4 年 5 月 1 5 日付けでブタベスト条約に基づく国際寄託に移管されており、受託番号 F E R M B P - 3 8 5 4 が付与されている。

エシェリヒア・コリ A J 1 3 1 3 8 は、平成 7 年 8 月 1 7 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 郵便番号 3 0 5）に受託番号 F E R M P - 1 5 1 1 5 として寄託されている。本株は平成 8 年 6 月 7 日付けでブタベスト条約に基づく国際寄託に移管されており、受託番号 F E R M B P - 5 5 6 5 が付与されている。

15 配列表

配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

20 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成 DNA

配列の特徴：エシェリヒア・コリ g l t A 遺伝子増幅用プライマー

配列

25 TCTGTTACCT GCAGACGTCG 20

WO 97/08294

PCT/JP96/01944

20

配列番号 : 2

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

5 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : エシェリヒア・コリ g l t A 遺伝子増幅用プライマー

配列

AAGTGAATTC CGCCAGAACC 20

請求の範囲

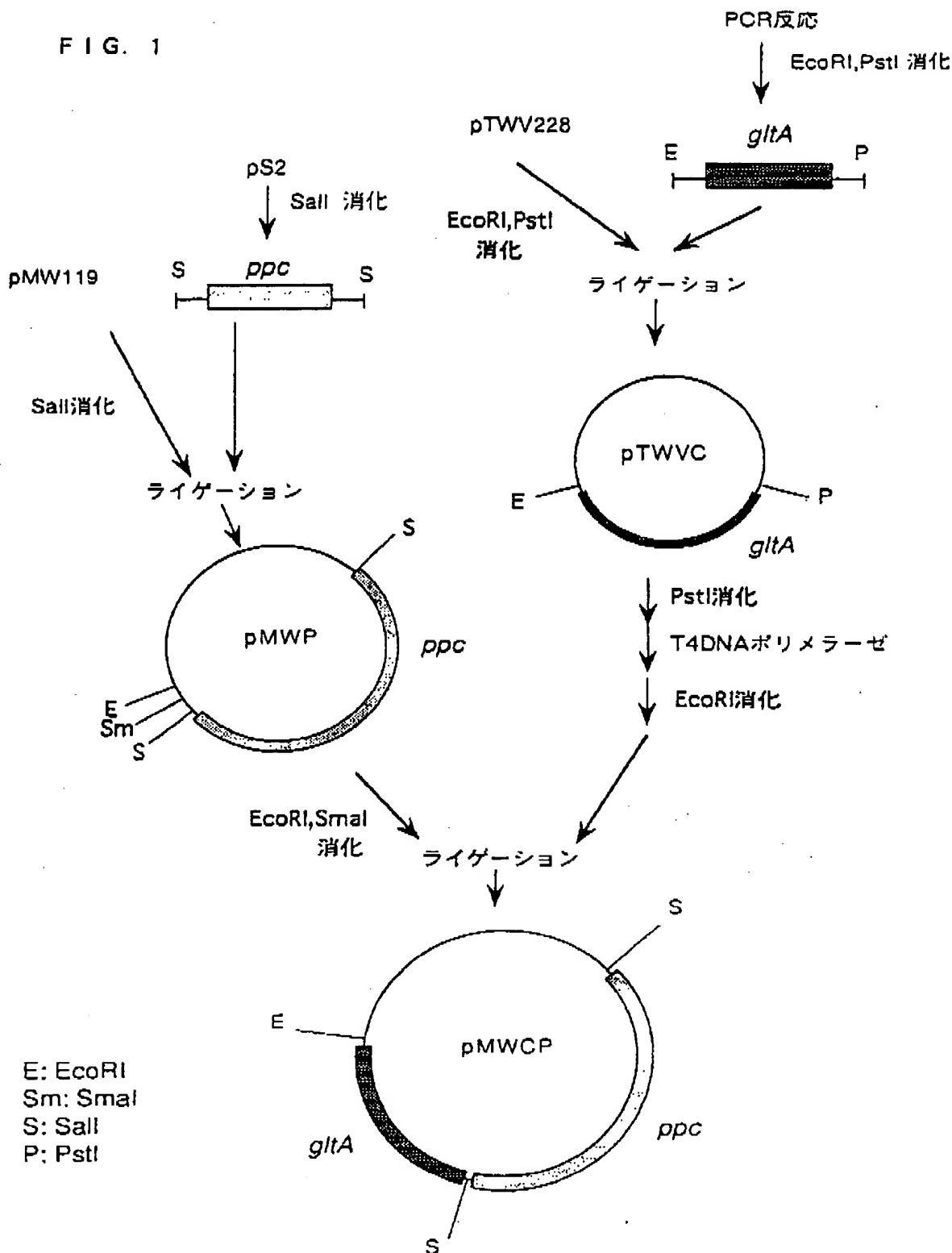
1. エシェリヒア属に属し、バリン感受性を示し、クエン酸シンターゼ活性及びフォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ活性が増幅され、かつL-グルタミン酸生産能を有する菌株。
- 5 2. α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が欠損もしくは低下している請求の範囲第1項記載の菌株
3. エシェリヒア・コリに属する請求の範囲第1項又は第2項記載の菌株。
4. エシェリヒア・コリB株に属する請求の範囲第3項記載の菌株。
- 10 5. エシェリヒア・コリK-12株に属する請求の範囲第3項記載の菌株。
6. 請求の範囲第1項ないし第5項記載の菌株を液体培地に培養し、培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする発酵法によるL-グルタミン酸の製造法。

WO 97/08294

1 / 1

PCT/JP96/01944

FIG. 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01944

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁶ C12N1/21, C12P13/14, C12N15/01// (C12N1/21, C12R1:19)
(C12P13/14, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁶ C12N1/21, C12P13/14, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 5-244970, A (Ajinomoto Co., Inc.), September 24, 1993 (24. 09. 93) & US, 5378616, A	1 - 6
Y	JP, 63-119688, A (Kyowa Hakko Co., Ltd.), May 24, 1988 (24. 05. 88) (Family: none)	1 - 6
Y	JP, 2-472, A (Kyowa Hakko Co., Ltd.), January 5, 1990 (05. 01. 90) & EP, 88166, A & US, 5236831, A	1 - 6
A	JP, 60-87788, A (Ajinomoto Co., Inc.), May 17, 1985 (17. 05. 85) & EP, 143195, A & US, 4757009, A	1 - 6
A	JP, 62-55089, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), March 10, 1987 (10. 03. 87) & FR, 2581653, A	1 - 6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 11, 1996 (11. 09. 96)

Date of mailing of the international search report

September 24, 1996 (24. 09. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/01944

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
C12N 1/21, C12P 13/14, C12N 15/01// (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 13/14, C12R1:19)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
C12N 1/21, C12P13/14, C12N15/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP. 5-244970, A (味の素株式会社) 24.9月.1993 (24.09.93) & US, 6378616, A	1-6
Y	JP, 63-119688, A (協和発酵工業株式会社) 24.5月.1988 (24.05.88) (ファミリーなし)	1-6
Y	JP, 2-472, A (協和発酵工業株式会社) 5.1月.1990 (05.01.90) & EP, 88166, A & US, 5236831, A	1-6
A	JP, 60-87788, A (味の素株式会社) 17.5月.1985 (17.05.85) & EP, 143195, A & US, 4757009, A	1-6
A	JP, 62-55089, A (旭化成工業株式会社) 10.3月.1987 (10.03.87) & FR, 2581653, A	1-6
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 11.09.96	国際調査報告の発送日 24.09.96	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 印	4B 9162
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)